

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. A. Kröncke

Enzymatische Bestimmung des Glukoseabbaus und der Milchsäurebildung bei gemeinsamer Inkubation isolierter Streptokokkus mutans Stämme

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gabriele Wendel
aus Fürth

1979

1070 # 305

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. A. Kröncke

Enzymatische Bestimmung des Glukoseabbaus und der Milchsäurebildung bei gemeinsamer Inkubation isolierter Streptokokkus mutans Stämme

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Gabriele Wendel
aus Fürth

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.1979

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung	2
II. Problemstellung	7
III. Literaturübersicht	8
IV. Material und Methode	14
A. Bakterien	14
1. Charakterisierung der Bakterien	14
2. Anzucht der Bakterien	18
3. Kombination der Sero- und Sero- biotypen	19
B. Versuchsbeschreibung	20
1. Aufbereitung der Bakterien	20
2. Versuchsansätze	21
3. Inkubationsdauer	23
C. Enzymatische Analytik	24
1. Bestimmung der Glukosekonzentration	24
2. Bestimmung der Milchsäurekonzentration	25
V. Ergebnis und Diskussion	26
VI. Zusammenfassung	37
VII. Schrifttum	38

I. Einleitung

Ein noch nicht in allen Einzelheiten geklärtes, multifaktorielles Wechselspiel in den Plaques führt zur Auflösung der Hydroxylapatitkristalle, zur Karies. Für ihre Häufigkeit und Aktivität sind nach Keyes (1969) folgende Punkte verantwortlich zu machen.

- Art und Anzahl der Bakterien auf der Zahnoberfläche
- Die Zusammensetzung der Nahrung
- Und der Widerstand der Zähne, den sie dem bakteriellen Angriff entgegensetzen können

Die Anzahl der Bakterien in den Plaques ist sehr hoch. Nach Strålfors (1950) beträgt sie $400 \cdot 10^6$ Bakterien pro Milligramm Plaque (Naßgewicht). Davon dominieren neben Veillonellen, Neisserien, Laktobazillen, Corynebakterien, Aktinomyzeten, Nokardien und anderen zahlenmäßig unbedeutenden Mikroorganismen mit ca. 70 % die anaeroben Streptokokken (Frostell, 1960; Gibbons et al. 1964).

Eine Untergruppe dieser Spezies, nämlich *Streptokokkus mutans*, von Clarke (1924) als erstem aus Plaque vom Menschen isoliert und beschrieben, erwies sich als besonders kariogen. So vermag sie nach Bowden (1969a), Gibbons et al. (1966), Fitzgerald und Keyes (1960), Fitzgerald (1968), Krasse (1966) und Michalek (Feb. und Mai 1977) unter bestimmten Bedingungen Karies beim Tier hervorzurufen.

Ebenso scheint es, daß *Streptokokkus mutans* eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Karies beim Menschen spielt (Carlsson, 1967; Duany, 1970; Hoermann et al., 1972; Ikeda et al., 1973; Jordan et al., 1972; Krasse et al., 1968; Shklair et al., 1972; Stoppelar et al., 1969; Stoppelar, 1971; Zinner und Jablon, 1968).

Nach B. und E. Ranke verdanken sie ihre kariesätiologische Bedeutung folgenden Eigenschaften:

- Synthese intrazellulärer Polysaccharide (IPS)
- Synthese extrazellulärer Polysaccharide (EPS)
- Starke Säurebildung

Beinahe alle Stämme von *Streptokokkus mutans* können intrazelluläre Polysaccharide vom Glykogen-Amylopectintyp bilden. Sie werden bei einem Überangebot von Kohlenhydraten synthetisiert. Die Bedeutung der intrazellulären Polysaccharidspeicherungen für die Kariesentwicklung liegt darin, daß sie als Reservekohlenhydrate dienen können, die dann zu Säuren abgebaut werden, wenn die exogene Kohlenhydratzufuhr reduziert ist oder fehlt (Gibbons und Socransky, 1962; Gibbons, 1964). Außerdem sind IPS-speichernde Mikroorganismen entscheidend am Ökosystem innerhalb der Plaque beteiligt, da sie eine wesentlich längere Überlebenszeit haben als jene Bakterien, die dazu nicht in der Lage sind (van Houte et al., 1969; Bermann und Gibbons, 1966).

Die Fähigkeit aller Streptokokkus mutans-Stämme, aus Saccharose extrazelluläre, dextranähnliche Polysaccharide zu bilden, spielt eine wichtige, wenn nicht die wichtigste Rolle in ihrer kariogenen Wirkung (Stoppelar et al., 1971; Gibbons, 1968; Montville et al., 1977). Mit diesen Polysacchariden sind sie nämlich in der Lage, sich zusammen mit Speichelkomponenten als eine festhaftende Plaque an der Zahnoberfläche anzulagern. Aufgrund der klebrigen Konsistenz und der Art der glykosidischen Bindung dieser Polysaccharide sind sie entscheidend am Dickenwachstum der Plaque beteiligt (Guggenheim und Schröder, 1967; Dahlqvist et al., 1967; Wood und Critchley, 1966; Guggenheim, 1970). Unter dieser Dextranplaque werden anaerobe Verhältnisse über längere Zeit aufrecht erhalten. Dadurch kommt es zur Anreicherung von Säure und zur pH-Erniedrigung (Ranke und Ranke, 1970).

Eine Rolle bei der Anheftung am Zahnschmelz wird auch der Lipoteichonsäure zugeschrieben, die von Wicken und Knox, 1975, an der Zelloberfläche von Streptokokkus mutans nachgewiesen wurde.

Als wichtigste Säure wurde seit Miller die Milchsäure als Gärungsprodukt aus Kohlenhydraten bezeichnet. Versuche von E. und B. Ranke, 1970 und 1971, und von Stanley et al., 1972, zeigen, daß Streptokokkus mutans eine sehr hohe Milchsäurebildung hat, die 60 - 90 % der gesamten gebildeten Säure

erreichen kann. Daß aber in den Plaques bei dem Gärungsprozeß auch noch mit anderen Säuren, wie Essig-, Butter-, Ameisen- und Propionsäure, wenn auch anteilmäßig in sehr viel geringerem Maße, zu rechnen ist, zeigen Ranke et al., 1964, Geddes, 1975 und Distler und Kröncke, 1978.

Es hängt von der Funktion des aeroben Speichelsystems ab, wieviel Säure in den Plaques gebildet wird. Kröncke und Lässig (1961) konnten zeigen, daß bezüglich der Amylaseaktivität zwischen kariesaktiven und kariesresistenten Personen keine Unterschiede zu verzeichnen sind. Wohingegen die Hexokinase-, Aldolase- und Triosephosphatdehydrogenaseaktivität im Speichel bei kariesaktiven Personen deutlich gehemmt sind (Bramstedt und Naujoks, 1962, Bramstedt und Ahrens, 1963). Die Folge davon ist eine Verminderung der "oral sugar clearance" (Lundqvist, 1952), was ein längeres Verweilen der Zucker in der Mundhöhle bedeutet.

Die vom Speichel nicht verarbeiteten Kohlenhydrate diffundieren nun in das anaerobe Plaquesystem und werden dort von den Mikroorganismen zu Säure vergoren (Bramstedt et al., 1963). Je höher das Kohlenhydratangebot, desto höher die Milchsäurebildung. Dabei sinkt der pH innerhalb kurzer Zeit vom normalen Wert, der bei ca. pH 6,8 liegt (Frostell, 1974) bis ca. pH 5,4 und noch darunter, womit der kritische Wert für die Auflösung des Schmelzes erreicht ist (Gehring,

1969). Da die Bildung der Milchsäure von den Mikroorganismen in den Plaques über den Embden-Meyerhof-Weg abläuft (Dallmeier, 1970), muß die Aldolaseaktivität von Mikroorganismen, die besonders kariesaktiv sind, erhöht sein. Dies wurde von Bramstedt et al. (1964) bestätigt.

II. Problemstellung

So stellt die Bildung von Säuren, speziell die der Milchsäure, die eigentliche Noxe zur Entstehung kariöser Läsionen dar. In zahlreichen Forschungsarbeiten wurde die Säurebildung bei monoinkubierten Mikroorganismen oder in den Plaques gemessen. Dabei läßt sich aber keine Aussage darüber machen, ob sich die Menge der gebildeten Milchsäure von den einzelnen Stämmen der Mikroorganismen addiert, oder ob sie als ein Ergebnis des Zusammenwirkens mehrerer Mikroorganismen zu werten ist. So postulierten schon 1937 Hansen, Fosdick und Epple, daß nur eine Mischung von Mikroorganismen fähig wäre, genug Säure zu produzieren, um den kariösen Prozeß einzuleiten.

In der folgenden Arbeit soll nun untersucht werden, ob sich die Stoffwechselaktivität gemeinsam inkubierter Streptokokkus mutans-Stämme, die sich aufgrund der serologischen bzw. serobiologischen Eigenschaften unterscheiden, gegenüber den monoinkubierten Stämmen ändert. Die Stoffwechselaktivität wird anhand des Glukoseverbrauchs und der Laktatgewinnung in einem anaeroben Glukosenährmedium gemessen.

III. Literaturübersicht

Über den Metabolismus isolierter Mundhöhlenbakterien liegen inzwischen zahlreiche Untersuchungen vor. Dagegen existieren vergleichsweise wenige Arbeiten, die sich mit der synergistischen und antagonistischen Beziehung dieser Organismen untereinander befassen.

So untersuchten Hoshino et al. (1976) den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion bei gemeinsamer Inkubation des Streptokokkus mutans-Stammes PK 1 mit Zellen von Neisseria Ne - 15.

Mikroorganismen	Glukoseverbrauch $\mu\text{Mol/ml/15 min}$	Laktatbildung $\mu\text{Mol/ml/15 min}$
PK 1	3.20	5.45
Ne - 15	0.05	0.00
PK 1 + Ne - 15	3.10	0.17

Tab. 1: Gemischte Inkubation von Neisseria Ne 15 mit Strep.
mutans PK 1

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wird bei gemeinsamer Inkubation kein Einfluß auf den Verbrauch der Glukose genommen, die Laktatbildung aber wird vermindert. Der Betrag der gebildeten Milchsäure läßt vermuten, daß Ne - 15 das von Strepto-

kokkus mutans PK 1 gebildete Laktat unter aeroben Bedingungen reduziert. 80 % des von Strep. mutans PK 1 gebildeten Laktats wurde von Ne - 15 zu Acetat und Kohlendioxyd umgewandelt. Diese Umwandlung in eine schwache und flüchtige Säure läßt die Autoren vermuten, daß die Anwesenheit von Neisserien in den Plaques die Karies vermindert.

Bereits seit längerer Zeit sind Beziehungen zwischen Streptokokken und Veillonellen bekannt. Mikx et al. (1972) beimpften keimfreie Osborne-Mendel-Ratten entweder mit dem Strep. mutans-Stamm GS 5 oder mit Strep. sanguis 34 oder einen dieser Stämme kombiniert mit Veillonella alcalescens OMZ 193. Die Streptokokkenstämme konnten homofermentativ Laktat bilden. Bei Veillonella alcalescens war bekannt, daß sie Laktat zu Propionsäure, Acetat, Kohlendioxyd und Wasserstoff fermentierten (Rogosa et al., 1965). Nach 30 Tagen Versuchsdauer ließ sich feststellen, daß die Kariesaktivität bei den Ratten, die mit der Kombination Strep. mutans und Veillonella alcalescens beimpft wurden, deutlich niedriger war, als bei den Ratten, die nur mit einem Streptokokkenstamm beimpft wurden. Mikx et al. führten die Reduktion der Kariesaktivität hauptsächlich auf die Fähigkeit von Veillonella alcalescens Laktat zu schwachen Säuren zu fermentieren zurück, schlossen aber die Möglichkeit, daß Veillonella alcalescens einen hemmenden Effekt auf den Stoffwechsel der Streptokokken hat, nicht aus.

1975 erörtern Mikx und van der Hoeven erneut die Symbiose eines Streptokokkenstammes mit Veillonella. Sie vermuteten, daß Streptokokkus mutans hinsichtlich seiner Laktatproduktion das Wachstum von Veillonella alcalescens beeinflußt. In Kulturen, in denen das Wachstum von Strep. mutans durch die Glukosekonzentration kontrolliert wurde, war die produzierte Milchsäure von Veillonella vollständig verbraucht worden. Auch van der Hoeven et al. (1978) erörtern die synergistische Beziehung von Veillonella alcalescens und Streptokokkus mutans in der Plaque von gnotobiotischen Ratten. Bei den Strep. mutans-Stämmen handelte es sich um den Stamm FIL und Stamm C67-1. Strep. mutans-Stamm FIL produzierte wesentlich mehr Laktat in den Plaques als C67-1. Entsprechend war 1. das Mengenverhältnis von Veillonella in der Kombination mit FIL größer als mit C67-1, war 2. die Laktatmenge in den Plaques bei der Kombination mit FIL und Veillonella wesentlich geringer und war 3. die Biomasse, angezeigt durch DNA, in den Fissuren, die FIL und Veillonella enthielten, reduziert. Die Verfasser glaubten, daß die deutliche Kariesverminderung bei den Ratten, beimpft mit FIL und Veillonella alcalescens, auf diese drei Punkte zurückzuführen war.

Carlsson (1971) untersuchte Streptokokkus mutans, Stamm JC2, und Streptokokkus sanguis, Stamm 804, in einer Mischkultur. Bei sonst gleichen Ernährungsbedürfnissen benötigte der Strep.

mutans noch p-Aminobenzoessäure. Bei Inkubation von Strep. mutans und Strep. sanguis in einem aminobenzoessäurefreien Medium förderte Strep. sanguis das Wachstum von Strep. mutans derart, daß Carlsson die Wechselwirkung als Parasitismus bezeichnete. Er folgert daraufhin, daß p-Aminobenzoessäure die Populationsdichte von Streptokokkus mutans bestimmen könnte.

Mit in vitro Methoden untersuchten Miller und Kleinmann (1974) die Beeinflussung von Streptokokkus mutans durch andere nicht Plaque bildende Mikroorganismen in der Mundhöhle. Sie konnten zeigen, daß weder Strep. mitis noch Strep. pyogenes, Staphylokokkus aureus und Neisseria catarrhalis, gepaart mit Strep. mutans 6715, den Betrag der gebildeten Plaque, verglichen mit dem, der durch die reine Kultur von Strep. mutans 6715 gebildet wurde, merkbar beeinflussten. In Kulturen allerdings, wo Strep. mutans 6715 entweder mit Laktobazillus casei, Strep. faecalis oder mit Strep. salivarius gemischt war, war die Menge der Plaque um 54 %, 97 % und 84 % geringer als die, die von den reinen Kulturen gebildet wurde. Laktobazillus casei, Strep. faecalis und Strep. salivarius können Saccharose verwerten. Daher nehmen die Autoren an, daß dieses Substrat der hemmende Faktor für das Wachstum von Strep. mutans oder für die Bildung von EPS in gemischten Kulturen war.

Eine Kombination von Laktobazillus casei mit Streptokokkus sanguis resultierte in einer 98 %igen Hemmung der Plaquebildung, verglichen mit reinen Kulturen von Streptokokkus sanguis.

34 %ig war die Hemmung der Plaquebildung, wenn *Laktobazillus casei* mit *Streptokokkus mutans* NCTC 10449 zusammenwirkte.

Ein 98 %iges Anwachsen der Plaquebildung war dagegen bei einer gemeinsamen Inkubation von *Candida albicans* und *Streptokokkus mutans* 6715 zu verzeichnen, wenn dieses Ergebnis dem Betrag der gebildeten Plaque von reinen Kulturen von *Streptokokkus mutans* gegenübergestellt wurde.

Untersuchungen von Parson und Miller (1974) zeigten, daß primär nicht Plaque bildende Mikroorganismen in gemischten Kulturen vermehrt und mit *Streptokokkus salivarius* inkubiert ganz beträchtlich mehr Plaquebildung zeigten.

Stephan und Hemmens (1947) kombinierten jeweils *Laktobazillus* mit einem schwach und einem stark acidogenen *Streptokokken*-stamm. Um zu sehen, ob diese Organismen die Fähigkeit von *Laktobazillus* niedrige pH-Werte zu bilden, d.h. kariogen zu sein, verminderten oder vermehrten, wurden sie auch hier zum Vergleich wiederum einzeln inkubiert. Wie aus Abb. 1 und 2 zu ersehen ist, wurde der pH-Abfall von *Laktobazillus* in beiden Fällen reduziert.

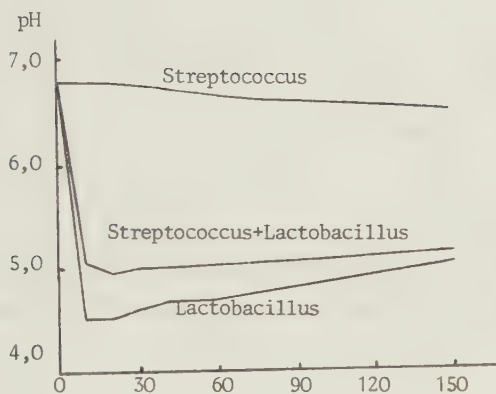


Abb. 1:
Vergleich der pH-Kurven des
rein und gemischt inkubier-
ten schwach azidogenen Strepto-
kokkus und Laktobazillus
(aus: Stephan und Hemmens, 1947)

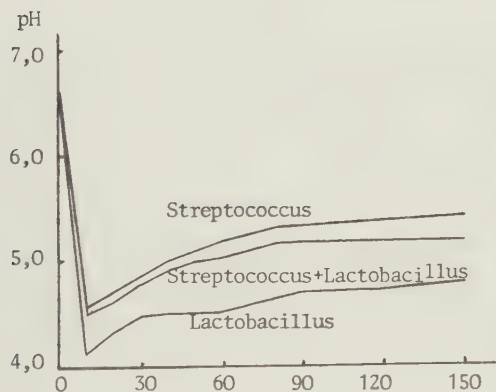


Abb. 2:
Vergleich der pH-Kurven des
rein und gemischt inkubier-
ten stark azidogenen Strepto-
kokkus und Laktobazillus
(aus: Stephan und Hemmens, 1947)

IV. Material und Methoden

A. Bakterien

1. Charakterisierung der Bakterien

Obwohl die Stämme von *Streptokokkus mutans* phenotypisch viele gemeinsame Eigenschaften aufweisen (Carlsson, 1968; Edwardsson, 1968; Guggenheim, 1968), sind sie genetisch und in ihren Antigen-Eigenschaften heterogen.

So unterschied Bratthall (1970) innerhalb der Art von *Streptokokkus mutans* mit Hilfe von monospezifischen Antisera fünf serologische Gruppen, die er als a, b, c, d und e klassifizierte. Weiterhin gelang ihm die Identifikation der Serotypen mit Antisera, die er mit fluoreszierenden Stoffen markierte (Bratthall, 1972). Shklair und Keene (1974) stellten ein biochemisches Schema für die Trennung der Serotypen von *Streptokokkus mutans* auf (Serobiotypen).

Coykendall (1970 und 1971) unterteilte *Streptokokkus mutans* hinsichtlich ihrer Unterschiedlichkeit in der Basenzusammensetzung und Basensequenz der DNA in vier Gruppen und unterschied 1974 aufgrund genetischer, antigenener und biochemischer Eigenschaften vier Untergruppen von *Streptokokkus mutans*.

Von Facklam (1974) wurde *Streptokokkus mutans* in 8 Biotypen (I - VII) unterteilt, und Hardie und Bowden (1974) fanden bezüglich des Vorkommens reduzierender Zucker in den Zellwänden drei verschiedene Muster: 1. Glukose, Galaktose und Rhamnose, 2. Galaktose und Rhamnose und 3. Glukose und Rhamnose. Sie vermuteten, daß die serologischen Typen a - e ebenfalls mit Hilfe der Zellwandantigene unterschieden werden können (siehe Tabelle 2).

Für die vorliegende Arbeit standen Reinkulturen von 10 *Streptokokkus mutans* Stämmen zur Verfügung (Tabelle 3).

Bratthall (1970) Serologische Gruppen	Coykendall (1970/71) Genetische Gruppen	Shklair u. Keene (1974) Biochem. Schema für die Trennung d. Serotypen	Hardie u. Bowden (1971) Kohlenhydratkomponente der Zellwände
a	IV	Fermentation von: Mannit, Sorbit, Raffinose, Melibiose	Glukose, Galaktose und Rhamnose
b	II	Fermentation von: Mannit, Sorbit, Raffinose, Melibiose, NH von L-Arginin, Mannit u. 2E/ml Bacitracin	Galaktose und Rhamnose
c	I	Fermentation von: Mannit, Sorbit, Raffinose, Melibiose, Mannit u. 2E/ml Bacitracin	Glukose und Rhamnose
d	III	Fermentation von: Mannit, Sorbit, Mannit u. 2E/ml Bacitracin	Glukose, Galaktose und Rhamnose
e (= Lancefield E)		Fermentation von: Mannit, Sorbit, Raffinose, Mannit u. 2E/ml Bacitracin	Glukose und Rhamnose

Stamm	serologische Eingruppierung		Herkunft
C2/21	Serobiotyp	a	Prof. Gehring ⁺
T3/52		b	
T3/53		c	
T5/13		d	
T3/67		e	
		"Turku"- Stämme	
626	Serotyp	a	
634		b	
441=NCTC 10449		c	
620		d	
638		e	

⁺Mikrobiologe am Lehrstuhl für experimentelle Zahnmedizin der Universität Würzburg, Sonderforschungsbereich Biologie der Mundhöhle.

Tab. 3: Die für die Untersuchungen verwendeten Strep. mutans
Stämme.

Die Stämme der Serobiotypen a - e entsprechen den
Serotypen a - e.

2. Anzucht der Bakterien

Die 10 Streptokokkenstämme lagen in Thioglykolat-Nährböden (Merck Art. 8191) vor. Von dort wurden sie durch einen Dreiecksausschlag auf Blutagarplatten (Firma Biotest) überimpft. Diese wurden dann unter anaeroben Bedingungen im Gaspak-Topf (Becton, Dickinson und Company) bei 5°C für 24 Stunden bebrütet und anschließend im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Um ein Überaltern der Kulturen zu verhindern, züchtete man sie nach jeweils 14 Tagen auf neuen Blutagarplatten an.

Zur Anzucht der Bakterien wurde ein flüssiges Nährmedium mit folgenden Substanzen verwendet:

Bacto Tryptose	20	g	Difco	0124-01
Hefe Extrakt	4	g	Difco	0127-01
Kochsalz	2,5	g	Merck-Art.	6404
L-Cystin	50	mg	Difco	0184-15
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5	g	Merck-Art.	6579
Natriumdihydrogenphosphat	0,6	g	Merck-Art.	6347
Glukose	10	g	Merck-Art.	8342

Die angegebenen Mengen wurden in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, mit aqua bidest auf einen Liter aufgefüllt und ca. 30 min. bei $80 - 90^{\circ}\text{C}$ auf einem Magnetrührgerät gerührt, um die Bestandteile rückstandslos zu lösen. Danach füllte man die Nährlösung in Flaschen von je ca. 80 ml ab und sterili-

sierte sie im Autoklaven 15 min., bei 120°C und 1 atü.

Um für einen Versuchsablauf die nötige Bakterienmenge zur Verfügung zu haben, wurde der jeweilige Streptokokkus mutans Stamm direkt von der Blutagarplatte in drei der ca. 80 ml Flaschen überimpft. Die Inkubation erfolgte dann in einem Brutschrank bei 37°C 17 Stunden lang, da nach Strålfors (1950) die höchsten Fermentaktivitäten bei den Streptokokken zu Beginn des Geometrischen Wachstums gemessen wurden und er die günstigste Bebrütungsdauer mit 15 - 18 Stunden angegeben hat.

3. Kombination der Sero- und Serobiotypen

Die Serotypen wurden derart kombiniert, daß jeder Stamm mit jedem inkubiert wurde (siehe Tabelle 4).

a + b	b + c	c + d	d + e
a + c	b + d	c + e	
a + d	b + e		
a + e			

Tab. 4: Kombinationsschema der Serotypen

Analog wurden die Turku-Stämme kombiniert. Eine weitere Gruppe der Kombination umfaßte Referenzstämmen und Turkustämme jeweils gleicher Sero- und Serobiotypen (siehe Tabelle 5).

St. 626	und	St. C2/21
St. 634	und	St. T5/52
St. 441	und	St. T3/53
St. 620	und	St. T5/13
St. 638	und	St. T3/67

Tab. 5: Kombination der Tur-
kusstämme mit den
Reverenzstämmen

So ergaben sich 25 verschiedene Kombinationen, von denen jede wenigstens dreimal an jeweils verschiedenen Tagen inkubiert und ausgewertet wurde.

B. Versuchsbeschreibung

1. Aufbereitung der Bakterien

Nach 17stündiger Bebrütung zentrifugierte man die Flüssigkeit mit den Bakterien 10 min. bei 4000 U/min. und verwarf den Überstand. Der verbleibende Bodensatz wurde zur Reinigung von Stoffwechselprodukten und Resten der Nährlösung zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und jeweils wieder abzentrifugiert. Das gereinigte Zentrifugat wurde dann erneut in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, auf einem Magnetrührgerät homogenisiert und solange mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, bis es bei einer Wellenlänge von 620 nm eine Transmission von 0,1 aufwies (bezogen auf physiologische Kochsalzlösung; Photometer PMQ II mit Filter M4Q III, Carl Zeiss). Der Wert $T = 0,1$ erwies sich bei den Versuchen von Probst-Steinmann (1979) und Tischer (1979) insofern als günstig, als der Abbau der Glukose in einem für den Versuchsablauf günstigen Zeitraum verlief.

2. Versuchsansätze

Die Inkubation der Bakterien erfolgte in dem von Otto Warburg 1926 entwickelten und nach ihm benannten "Warburg Apparat" (Warburg Apparat V 166 B. Braun, Melsungen). Mittels der manometrischen Methode kann aufgrund der Änderungen von Gasvolumina in diesem abgeschlossenen System das Stoffwechselgeschehen der darin inkubierten Mikroorganismen erfaßt werden. Eine genaue Beschreibung dieser Methode gaben Umbreit et al., 1964. Diese Methode fand in den folgenden Untersuchungen jedoch keine Anwendung. Die Apparatur diente lediglich dazu, für die Bakterien konstant bleibende Bedingungen zu erreichen, wie die Temperatur von 37°C und ein gleichbleibendes anaerobes Milieu.

In jedem Warburgexperiment wurden je 2 reine Streptokokkus mutans Stämme und eine aliquote Mischung dieser Stämme untersucht. Man benötigte also 3 Ansätze, die sich jeweils aus 10 ml Flüssigkeitsvolumen zusammensetzten. Es wurden folgende Substanzen einpipetiert:

- 5 ml Phosphatpuffer in das Hauptgefäß
- 4 ml Bakteriensuspension
- 1 ml Glukoselösung m/25 in den Seitenarm

Die Bakterienmischungen bestanden aus je 2 ml Bakteriensuspension.

Puffer:

Verwendung bei allen Versuchen fand ein 0,5 m Phosphatpuffer.

Die Stammlösungen setzten sich zusammen aus:

- 179 g Natriumhydrogenphosphat auf 1 l H_2O (Merck Art. 6579)
- 69 g Natriumdihydrogenphosphat auf 1 l H_2O (Merck Art. 6346)

Durch Mischen bestimmter Quantitäten dieser Stammlösungen wurde der Phosphatpuffer auf ein pH von 7,0 eingestellt. In Vorversuchen stellte sich allerdings heraus, daß das pH bis nach Versuchsende um 2-3 pH Einheiten gesunken war. Dies konnte durch 4-fache Konzentration des Puffers behoben werden.

Substrat:

Als Substrat diente eine 1,25 m Glukoselösung. Durch Verdünnen dieser Glukoselösung mit Puffer und Bakteriensuspension ergab sich aber eine Endkonzentration von 1,250 m, bezogen auf den Gesamtansatz.

Nach dem Einpipettieren wurden die Gefäße an die Manometersäulen angeschlossen, in den Warburgapparat eingehängt und geschüttelt. Während der ersten 10 min. wurde dabei ein Gasgemisch von 90 % N_2 und 5 % CO_2 eingeleitet, um das anaerobe Milieu herzustellen. Mit dem Schließen der offenen Systeme und dem Einkippen der Glukoselösung aus dem Seitenarm des Warburggefäßes in das Bakterien-Puffergemisch erfolgte der Start des Versuches.

3. Inkubationsdauer

Die Inkubationsdauer wurde so gewählt, daß der Versuch vor völligem Abbau der Glukose abgebrochen wurde. Mögliche Beeinflussungen können nur mit unterschiedlichen Glukoseabbauraten der rein und gemischt inkubierten Stämme bestimmt werden.

Dies erwies sich insofern als schwierig, da innerhalb eines Versuchsansatzes die rein inkubierten Stämme bezüglich des zeitlichen Glukoseumsatzes teilweise stark differierten. Hinzu kam noch, daß die *Streptokokkus mutans*-Stämme die Glukose von Tag zu Tag unterschiedlich verstoffwechselten. Dies läßt sich einerseits mit der natürlichen biologischen Variabilität der Bakterien, andererseits dadurch erklären, daß man nicht mit synchronisierten Kulturen (Schlegel, 1974), d.h. mit gleichen Zellteilungsraten arbeitete. Somit wurden die Mikroorganismen an verschiedenen Punkten der stationären Wachstumsphase geerntet, wodurch sich jeweils das Verhältnis lebender zu toter Bakterien änderte (Schmid, 1974). Aus diesem Grunde mußte mit Schwankungen bei der Milchsäurebildung bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen gerechnet werden. So war es bei verschiedenen Bakteriengemischen manchmal notwendig, fünf und mehr Durchgänge durchzuführen, um zu einem reproduzierbaren Ergebnis zu kommen.

C. Enzymatische Analytik

Nach Beendigung des Versuches wurden die Ansätze in Reagenzgläser umgefüllt und 20 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert, um die Bakterien von der Flüssigkeit zu trennen. Um sicher zu gehen, daß der klare Überstand nach der Zentrifugation auch wirklich bakterienfrei war, wurde er über einen Membranfilter filtriert. In Proben dieser dann bakterienfreien Inkubationslösung erfolgte die enzymatische Bestimmung der darin verbliebenen Glukose und der gebildeten Milchsäure.

1. Bestimmung der Glukosekonzentration

Eine spezifische Nachweis- und Bestimmungsmethode für Glukose arbeitet mit der Glukose-Oxydase (GOD). Dieses in Schimmelpilzen gefundene Enzym oxydiert Glukose spezifisch in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser zu Gluconsäure und H_2O_2

Glukose-Oxydase



Das entstehende Wasserstoffsuperoxyd reagiert mit dem Redoxindikator ABTS und dem Enzym Peroxydase (POD), wobei ABTS in einen Farbstoff übergeführt wird.

(ABTS = 2,2'-Azino-di 3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsr.-(6) - diammonium

Peroxydase



Der Farbstoff kann aufgrund seiner Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt werden (Eppendorf Photometer 6120). Dieser Wert stellt dann ein Maß für die Glukosemenge dar.

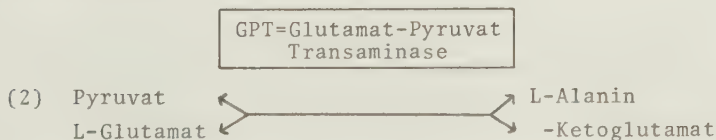
(Der Glukosenachweis erfolgte mit der Boehringer "Test-Combination-Glukose", Best. Nr. 124028).

2. Bestimmung der Milchsäurekonzentration

Die Milchsäure wurde mit dem "UV-Test zur Bestimmung von L-Milchsäure in Lebensmitteln" nachgewiesen (Boehringer Lebensmitteldiagnostik Best. Nr. 138084). Dabei wird L-Milchsäure durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) zu Pyruvat oxydiert.



Das Reaktionsgleichgewicht liegt hier weitgehend auf der Seite des Lactats. Mit Hilfe einer nachgeschalteten Transaminierungsreaktion wird das Pyruvat abgefangen und somit das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben.



Die gebildete NADH-Menge in Reaktion (1) ist der Milchsäure-Menge äquivalent und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 334 nm bestimmt.

V. Ergebnis und Diskussion

Bei der überwiegenden Mehrzahl der gemischten Bakterienkulturen verhält sich die Milchsäurebildung additiv, das heißt, die Gesamtmenge an Säure setzt sich aus den Teilmengen zusammen, die von den jeweiligen Stämmen bei Einzelinkubation gebildet werden. In der folgenden Tabelle sind die Laktatwerte der rein inkubierten Stämme den gemischt inkubierten Stämmen gegenübergestellt. Dabei wurden die Werte der beiden reinen Stämme addiert. Da dies aber einem Versuchsansatz von 20 ml entsprechen würde, mußte, um einen direkten Vergleich zu bekommen, der ermittelte Betrag der gemeinsam inkubierten Stämme verdoppelt werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß sich durch die Addition alle eventuellen Fehler, die sich bei der Inkubation und der enzymatischen Messung ergaben, ebenfalls addieren.

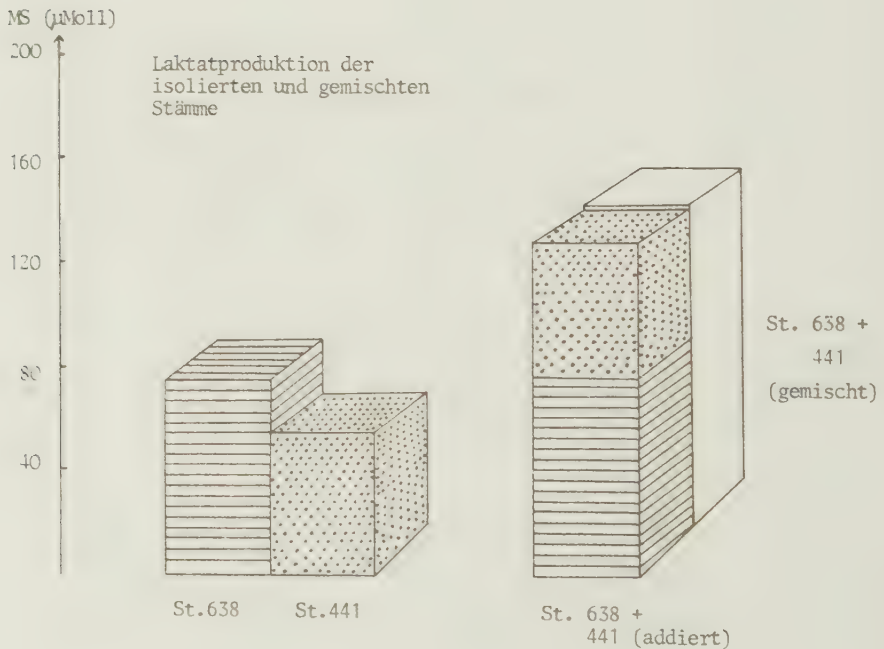
Stamm	Laktatwerte (Einzelwerte) der rein inkubierten Stämme (μMol)	rechnerische Summe der Einzelwerte (μMol)	Laktatwert der gemischt inkubierten Stämme (μMol)
C2/21 + T3/52	62,96 + 62,20 58,44 + 75,97	= 125,16 = 134,41	121,78 134,84
C2/21 + T3/53	57,46 + 65,19 44,46 + 52,35	= 122,65 = 96,81	123,62 93,38
C2/21 + T3/67	54,63 + 39,01 42,77 + 28,10	= 93,64 = 70,87	97,18 74,66
T3/52 + T5/13	77,54 + 71,99 47,07 + 75,53	= 149,53 = 122,60	148,76 129,52

Stamm	Laktatwerte (Einzelwerte) der rein inkubierten Stämme (µMol)	rechnerische Summe der Einzelwerte (µMol)	Laktatwert der gemischt inkubierten Stämme (µMol)
T3/52 + T3/67	46,79 + 48,21 81,19 + 44,57	= 95,00 = 125,76	94,34 122,44
T3/53 + T3/67	63,61 + 47,61 49,90 + 43,26	= 111,22 = 93,16	107,20 88,80
626 + 638	29,65 + 47,23 68,46 + 61,21	= 76,88 = 129,67	74,10 128,64
634 + 441	22,26 + 65,84 32,32 + 48,92	= 88,10 = 81,24	81,97 81,84
634 + 620	23,45 + 46,09 32,97 + 38,96	= 69,54 = 71,93	69,10 69,54
634 + 638	17,79 + 25,73 26,28 + 62,14	= 43,52 = 88,42	45,38 86,74
441 + 620	33,57 + 19,31 55,51 + 46,91	= 52,88 = 102,42	45,80 102,96
441 + 638	53,21 + 73,40 59,15 + 52,89	= 126,61 = 112,04	127,70 110,14
620 + 638	69,54 + 73,40 55,29 + 54,09	= 142,94 = 109,38	120,12 109,26
638 + T3/67	73,67 + 59,91 54,71 + 39,83	= 133,58 = 93,54	134,50 92,94
620 + T5/13	59,91 + 65,14 29,00 + 71,67	= 125,05 = 100,67	124,28 107,74
441 + T3/53	45,32 + 71,29 54,09 + 54,74	= 116,61 = 108,83	116,00 109,60
634 + T3/52	25,36 + 72,05 11,97 + 35,10	= 97,41 = 47,07	100,02 49,20
626 + C2/21	71,18 + 64,70 68,29 + 58,82	= 135,88 = 127,11	137,14 119,06

Tab. 6: Gegenüberstellung des rechnerisch zu erwartenden Laktatwertes der rein inkubierten und des gemessenen Laktatwertes der gemischt inkubierten Streptokokkus mutans-Stämme

Das Ergebnis soll in einem Säulendiagramm anhand der Bakterienmischung der Stämme 638 und 441, repräsentativ für alle in der Tabelle angeführten gemischten Bakterienkulturen veranschaulicht werden (Abb.: 3).

Der Stoffwechsel der Streptokokken verläuft homofermentativ, d.h. es können theoretisch aus 1 Mol Glukose 2 Mol Milchsäure entstehen (Tanzer et al., 1969).



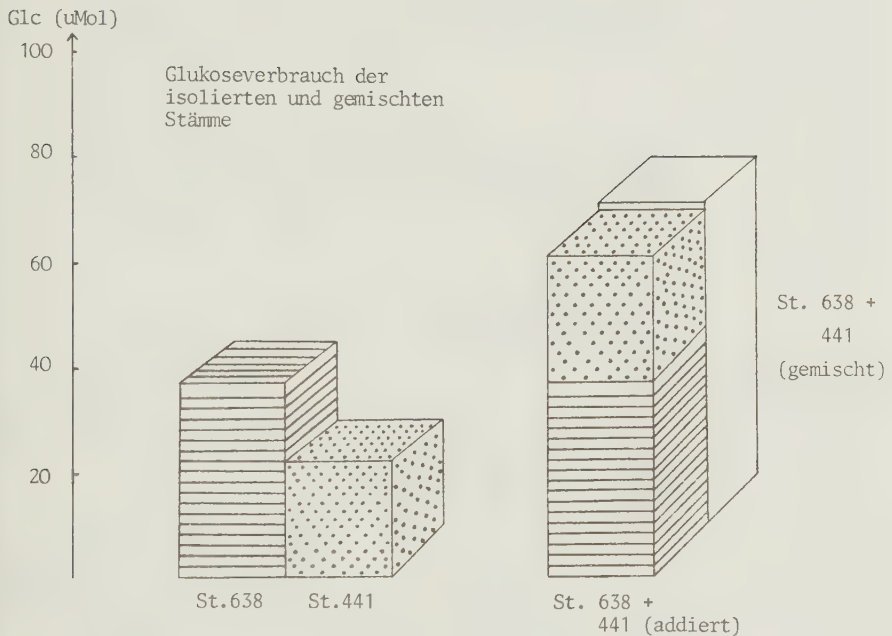


Abb.: 3

Aus diesem Grunde wurde für die Auftragung der Milchsäure der Glukosemaßstab halbiert, so daß 1 μ Mol Glukose, 2 μ Mol Lactat gegenüberstehen.

In allen Versuchen stimmt der Wert des Glukoseverbrauches, sowohl bei den rein inkubierten, wie auch bei den gemeinsam inkubierten, und der des daraus gebildeten Lactats sehr gut überein.

Theoretisch wäre es möglich, daß durchaus eine Beeinflussung innerhalb der gemeinsamen Inkubation vorhanden war, die aber mit den vorliegenden Methoden nicht erfaßt werden konnte. Gemeinsame Inkubation bedeutet Vermischen und das heißt, man mißt das statistische Mittel der Gesamtpopulation. Man müßte nach einer Möglichkeit suchen, die eine genaue Differenzierung zwischen den Stämmen anhand der Säurebildung erlaubt. Nur so würde sich feststellen lassen, welcher Stamm bei einer Bakterienmischung dominiert.

Bei 7 der insgesamt 25 Kombinationen ergibt sich ein ganz anderes Bild. Aus der Tabelle 7 geht hervor, daß bei der Mischung der Bakterien teilweise beträchtlich mehr Lactat gebildet wurde, als theoretisch zu erwarten gewesen wäre.

Stamm	Laktatwerte (Einzelwerte) der rein inkubierten Stämme (μMol)	rechnerische Summe der Einzelwerte (μMol)	Laktatwert der gemischt inkubierten Stämme (μMol)
C2/21 + T5/13	56,75 + 74,44	= 131,19	149,52
	59,21 + 76,84	= 136,05	154,66
T3/52 + T3/53	76,34 + 67,74	= 144,08	151,70
	78,95 + 59,58	= 138,53	154,54
T3/53 + T5/13	63,17 + 65,13	= 128,30	142,44
	48,70 + 75,26	= 123,96	150,62
T5/13 + T3/67	76,02 + 36,56	= 112,58	147,02
	74,66 + 51,64	= 126,30	151,94
626 + 634	68,23 + 26,55	= 94,78	136,80
	71,07 + 31,29	= 102,36	122,88
626 + 441	61,32 + 74,82	= 136,14	150,72
	71,56 + 61,11	= 132,67	147,80
626 + 620	31,34 + 31,18	= 62,52	75,54
	69,27 + 55,07	= 124,34	142,90

Tab. 7: Gegenüberstellung des rechnerisch zu erwartenden Laktatwerts der rein inkubierten und des gemessenen Laktatwerts der gemischt inkubierten Streptokokkus mutans-Stämme.

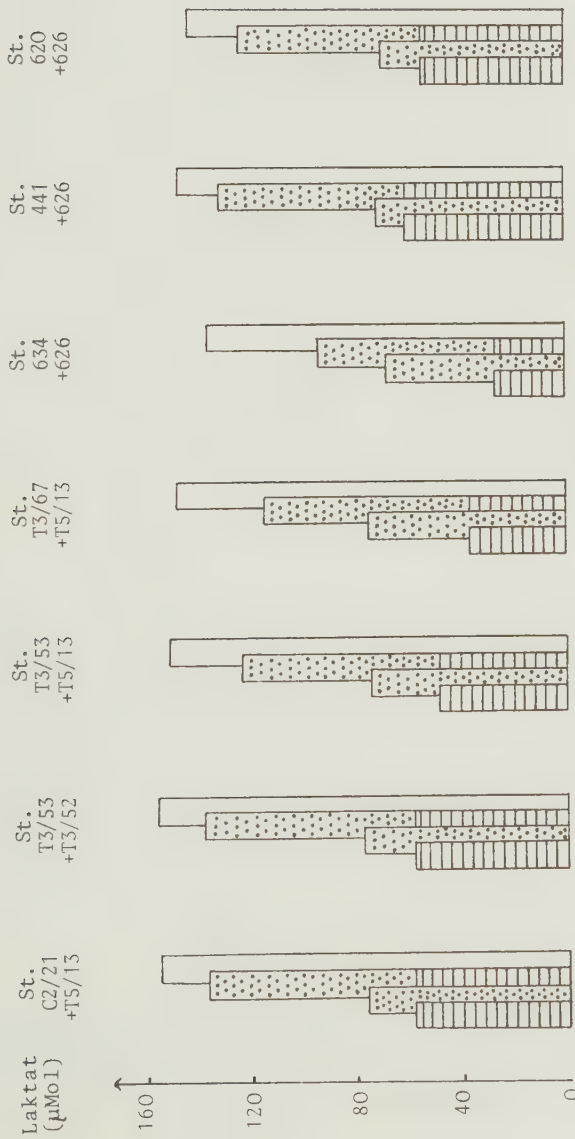


Abb. 4: Kombinationen mit Beeinflussung der Laktatproduktion

Im Durchschnitt war bei gemischten Ansätzen 10 - 44 % mehr Lactat gebildet worden, als rechnerisch durch Addition der Einzelwerte zu erwarten gewesen wäre (siehe Abb.: 4). Die gemeinsame Inkubation der Stämme 626 und 634 erbrachte mit jeweils 44 und 20 % mehr Lactatbildung die größte Beeinflussung. Das Anwachsen der Milchsäurekonzentration zeigt sich auch hier beinahe als ein Spiegelbild der fermentierten Glukose. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Glukosefermentation und der damit verbundenen vermehrten Lactatbildung könnte sein, daß bei diesen Bakterienmischungen ein oder mehrere Enzymsysteme des Glukosestoffwechsels aktiviert wurden. Dabei kämen vor allem zwei der wichtigsten Enzyme des Emden-Meyerhof-Weges, die Aldolase und die Hexokinase in Frage.

Bemerkenswert bei diesen Untersuchungen ist, daß bei einer Kombination gleicher Serotypen in keinem Fall eine Erhöhung der Lactatmenge gefunden wurde. Ansonsten erlauben die Ergebnisse keine Aussage darüber, daß eine erhöhte Lactatproduktion die Folge einer bestimmten Kombination von Serotypen ist. Die Frage, ob ein bestimmter Serotyp eine entscheidende Rolle spielt, müßte in einer breiter angelegten Versuchsreihe geklärt und statistisch erfaßt werden.

Auffallend jedoch ist, daß Serotyp a (Stamm 626) und Serotyp d in diesem Fall Stamm T5/13 an drei Kombinationen mit erhöhter Lactatproduktion beteiligt sind. Nach Bratthall (1972 + 1976),

Gehring (1976) und Qureshi et al. (1977) sollen Streptokokkus mutans-Stämme der Serotypen d und c in den Plaques von karies-aktiven Menschen dominieren. Die vermehrte Bildung von EPS der Serotypen d gegenüber den Serotypen c (Trautner et al., 1978) könnte vielleicht ein vermehrtes Säurebildungsvermögen und somit eine größere Kariogenität der Serotypen d zur Folge haben. Es ist aber noch nicht geklärt, ob die verschiedenen Serotypen voneinander abweichende kariogene Fähigkeiten haben.

Die Umsetzung der Glukose bei den Bakterienmischungen resultierte in einer 75 - 100 %igen Lactatproduktion. Teilweise wurden auch Werte über 100 % gemessen. Bei diesen Prozentangaben müssen jedoch folgende Faktoren berücksichtigt werden.

- Allgemein wird bei enzymatischen Bestimmungen für biologische Reaktionen mit einem Fehler bis zu 10 % gerechnet. Durch die Berechnung des prozentualen Umsetzungsgrades Glukose zu Milchsäure aus den Glukose- und Milchsäurewerten werden somit eventuelle Meßfehler der enzymatischen Tests vervielfacht.
- Der pH-Wert der Bakteriensuspensionen lag bei allen Stämmen unter pH 5,0 (Tab.: 8)

Stamm	pH	Stamm	pH
C2/21	4,20	626	4,85
T3/52	4,48	634	4,57
T3/53	4,17	441	4,23
T5/13	4,62	620	4,53
T3/67	4,48	638	4,56

Tab. 8: pH-Werte der Bakteriensuspensionen (Würth 1979)

Es müssen also bereits saure Stoffwechselprodukte vorhanden sein. Daher wurde jeder Stamm in jeweils drei Versuchsansätzen im Warburgapparat ohne Substratzugabe 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Ansätze, wie schon beschrieben, für die enzymatische Analytik vorbereitet und der Lactatwert bestimmt. Tabelle 9 zeigt die ermittelten Durchschnittswerte aus den drei Versuchsansätzen.

Stamm	Lactat (μMol)	Stamm	Lactat (μMol)
C2 21	8,37	626	4,57
T3 52	9,13	634	4,32
T3 53	7,34	441	8,95
T5 13	3,98	620	3,70
T3 67	5,39	638	2,93

Tab. 9: Milchsäurebildung bei *S. mutans* ohne Substratzugabe

Während der 17-stündigen Anzucht in der flüssigen Nährlösung haben die Mikroorganismen Gelegenheit aus der im Nährmedium enthaltenen Glukose Energiereserven in Form von intrazellulärer Polysacchariden anzulegen. Diese könnten sie dann in der Zeitspanne vom Zentrifugieren bis zu dem Zukippen der Glukose bei Versuchsbeginn zu Säuren verstoffwechselt haben.

- Weiterhin besteht eine mögliche Säurebildung aus extrazellulär gespeicherter Glukose. Die Fähigkeit dieser Mikroorganismen, EPS zu Säure abzubauen, bestätigten Distler und Kröncke (1979). Sie züchteten 12 reine Streptokokkus mutans-Stämme auf Saccharosenährböden an, inkubierten sie anaerob ohne Substrat und bestimmten dann den Säuregehalt. Die teilweise ziemlich hohen Lactatwerte führten sie auf eine Induktion teilgebundener Dextranasen während der Anzucht zu-

rück. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht direkt für unsere Versuche herangezogen werden, da in unserem Nährmedium keine Saccharose vorhanden war. Andererseits wird eine Bildung von EPS aus den Bestandteilen der Saccharose, nämlich Glukose und Fruktose, immer mehr erörtert (Bößmann, 1979).

- Die hohe Umsetzungsrate zu Lactat trat bei den Ansätzen auf, bei denen große Restglukosewerte (10 - 28 uMol Glc) bestimmt werden konnten. In diesen Fällen würde sich eine Lactatbildung aus gespeicherten Polysacchariden prozentual sehr viel stärker auswirken, als bei Versuchsansätzen, bei denen die Glukose nahezu vollständig verbraucht worden war. Berücksichtigt man diese Fehlerquelle, so stimmen die ermittelten prozentualen Lactatwerte mit den von Moll (1970) gefundenen Werten von 80 bis über 90 % überein.

Da in der vorliegenden Arbeit die neben Lactat entstehenden Stoffwechselprodukte nicht erfaßt werden, wurden die Versuchsansätze in gleichzeitig laufenden Untersuchungen von Distler und Kröncke (1978) mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie qualitativ und quantitativ bestimmt. Eindeutiges Hauptprodukt des Glukoseabbaus war Milchsäure, deren Anteil, abhängig vom untersuchten Stamm, zwischen 85 und 95 % der gebildeten Säuren betrug. Der Prozentsatz von Ameisensäure und Essigsäure lag unter 10 %. In den Ansätzen gemischter Streptokokkenkulturen blieb das Säurespektrum qualitativ und quantitativ unverändert. Dies galt auch für die Versuchsansätze mit erhöhter Lactatproduktion im Vergleich zu den Einzelstämmen.

Aus dem Säurebildungsvermögen der aus den Plaques isolierten einzelnen Stämme dürfen keine Rückschlüsse auf das Säurebildungsvermögen in den Plaques in vivo gezogen werden, da in derartigen Versuchen das Zusammenwirken des gesamten mikrobiellen Ökosystems in der Mundhöhle unberücksichtigt bleibt und das Speichelsystem außeracht gelassen wird.

Diese Versuche zeigen aber, daß sich das Säurebildungsvermögen verschiedener, selbst nahe verwandter Keime in Symbiose potenzieren kann, sodaß es noch weniger zulässig ist, aus Einzeluntersuchungen von reinen Bakterienstämmen Schlüsse auf deren Leistungen innerhalb der Mischflora einer Plaque in vivo zu ziehen.

Schließlich tragen die Erfahrungen aus diesen Experimenten wesentlich dazu bei, die Ergebnisse von Stoffwechseluntersuchungen in Plaques qualitativ und quantitativ zu beurteilen.

VI. Zusammenfassung

Bei 10 Streptokokkus mutans-Stämmen der Sero- bzw. Serobiotypen a - e wurden gemischte Kulturen gegenüber reinen Kulturen hinsichtlich einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung untersucht. Die anaerobe Inkubation erfolgte im Warburgapparat. Anhand der enzymatisch bestimmten Restglukose und der gebildeten Milchsäure wurde eine mögliche Beeinflussung diskutiert. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Bei 18 der insgesamt 25 Bakterienmischungen verhielt sich die Säurebildung verglichen mit den einzeln inkubierten Stämmen lediglich additiv.
- Bei den restlichen Kombinationen war eine positive Beeinflussung im Sinne einer um 10 - 44 % erhöhten Lactatbildung, verglichen mit dem rechnerisch zu erwartenden Wert der beiden rein inkubierten Stämme zu beobachten.
- Die Lactatbildung zeigte sich, wie zu erwarten, in allen Versuchen als ein Spiegelbild des Glukoseverbrauchs.
- Die Umsetzung der Glukose bei den Bakterienmischungen resultierte in einer 75 - 100 %-igen Lactatproduktion.

VII. Schrifttum

- BERMANN, K.S. und GIBBONS, R.P.: Jodophilic polysaccharide synthesis by human and rodent oral bacteria
Arch. oral Biol. 11, 533 (1966)
- BÜSSMANN, K.: Bildung, Zusammensetzung und Stoffwechsel der Plaque und ihre ätiologische Bedeutung für die Entstehung der Karies
Kariesprophylaxe 1, 3 (1979)
- BOWDEN, G.H.: The induction of rampant dental caries in monkeys (*Macaca irus*)
Caries Res. 3, 227 (1969)
- BRAMSTEDT, F. und NAUJOKS, R.: Biochemische Kariesforschung an der Universitätsklinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten Hamburg seit 1949
Dtsch. zahnärztl. Z. 17, 867 (1962)
- BRAMSTEDT, F. und AHRENS, G.: Zahn und Speichel
Adv. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 1, 135 (1963)
- BRAMSTEDT, F., NAUJOKS, R. und BENEDIKT, I.: "Oral sugar clearance" und Fermentaktivitäten im menschlichen Speichel
Dtsch. zahnärztl. Z. 18, 242 (1963)
- BRAMSTEDT, F., RANKE, E. und NAUJOKS, R.: Experimentelle Beiträge zur Biochemie der Plaque und ihre Beziehung zur Zahnkaries
Adv. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 2, 173 (1964)
- BRATTHALL, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling streptococcus mutans
Odont. Revy 21, 143 (1970)

- BRATTHALL, D.: Demonstration of streptococcus mutans in some selected areas of the world
Odont. Revy 23, 401 (1972)
- BRATTHALL, D.: Immunfluorescent identification of streptococcus mutans
Odont. Revy 23, 183 (1972)
- BRATTHALL, D. und KÖHLER, B.: Streptococcus mutans serotypes: Some aspects of their identification, distribution, antigenic shifts and relationship to caries
J. dent. Res. 55, C15 (1976)
- CARLSSON, J.: Presence of various types of nonhaemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity of man
Odont. Revy 18, 55 (1967)
- CARLSSON, J.: A numerical taxonomic study of human oral streptococci
Odont. Revy 19, 137 (1968)
- CARLSSON, J.: Growth of streptococcus mutans and streptococcus sanguis in mixed culture
Arch. oral Biol. 16, 963 (1971)
- CLARKE, J.K.: On the bacterial factor in the aetiology of dental caries
Brit. J. exp. Path. 5, 141 (1924)
- COYKENDALL, A.L.: Base composition of desoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci
Arch. oral Biol. 15, 365 (1970)
- COYKENDALL, A.L.: Genetic heterogeneity in streptococcus mutans
J. Bact. 106, 192 (1971)
- COYKENDALL, A.L.: Four types of streptococcus mutans based on their genetic, antigenetic and biochemical characteristics
J. Gen. Microbiol. 83, 327 (1974)

- DAHLKVIST, A., KRASSE, B., OLSSON, I. und GARDELL, S.:
Extracellular polysaccharides formed by caries-
inducing streptococci
Helv. odont. Acta 11, 15 (1967)
- DALLMEIER, E.: Vergleichende Untersuchungen über den
Glukose- und Hexitstoffwechsel von Plaque-
streptokokken
Naturwissenschaftl. Diss. Erlangen 1970
- DISTLER, W. und KRÖNCKE, A.: Intra- und extrazelluläres
Säurespektrum von in vitro inkubierter Plaque
Dtsch. zahnärztl. Z. 33, 629 (1978)
- DISTLER, W. und KRÖNCKE, A.: Lactate formation from
pure and mixed cultures of Strep. mutans
15th CED/IADR Jahrestagung, 23./24.9.1978
Utrecht
- DISTLER, W. und KRÖNCKE, A.: Unterschiede bei der In-
duktion polisaccharidabbauender Dextranase bei
Strep. mutans
Vortrag Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenfor-
schung der DGZMK, Marburg (1979)
- DUANY, L.F., ZINNER, D.D. und JABLON, J.M.: Identi-
fication of types of potentially cariogenic
streptococci on human tooth surfaces by the
fluorescent antibody techniques
J. dent. Res. 49, 1527 (1970)
- EDWARDSSON, S.: Characteristics of caries inducing human
streptococci resembling streptococcus mutans
Arch. oral Biol. 13, 637 (1968)
- ETSURO, H., YAMADA, T. und ARAYA, S.: Lactate degra-
dation by a strain of neisseria isolated from
human dental Plaque
Arch. oral Biol. 21, 677 (1976)
- FACKLAM, R.R.: Characteristics of streptococcus mutans
isolated from human dental plaque and blood
J. Bact. 24, No. 3, 313 (1974)

- FITZGERALD, R.J. und KEYES, P.H.: Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster
J. Amer. dent. Ass. 61, 9 (1960)
- FITZGERALD, R.J.: Dental caries research in gnotobiotic animals
Caries Res. 2, 139 (1968)
- FROSTELL, G.: Studies in oral biochemical bacteriology
Acta odont. scand. 18, Suppl. 29 (1960)
- FROSTELL, G.: The effect of ewing on the pH of dental plaque after carbohydrate consumption
Acta odont. scand. 32, 79 (1974)
- GEDDES, D.A.: Acids produced by human dental plaque metabolism in situ
Caries Res. 9, 98 (1975)
- GEHRING, F.: Über das Säurebildungsvermögen und die Lebensfähigkeit von Plaquestreptokokken bei Rohrzuckerkonzentrationen von 5 - 70 %
Dtsch. zahnärztl. Z. 24, Heft 3 (1969)
- GEHRING, F., KARLE, E.J., PATZ, J., FELFE, W. und BRADATSCH, U.: Vorkommen von Streptokokkus mutans-Varianten bei Mensch und Versuchstier
Dtsch. zahnärztl. Z. 31, 18 (1976)
- GIBBONS, R.J. und SOCRANSKY, S.S.: Intracellular polysaccharides storage by organisms in dental plaques
Arch. oral Biol. 7, 73 (1962)
- GIBBONS, R.J., SOCRANSKY, S.S., ARANJO, W.C. und VAN HOUTE, J.: Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque
Arch. oral Biol. 9, 365 (1964)

- GIBBONS, R.J.: Storage of carbohydrate by plaque micro-organisms and its relationship to dental caries
Adv. Fluorine Res. and Dental Caries, Prevention 2, 211 (1964)
- GIBBONS, R.J., BERMAN, K.S., KNOETTNER, P. und KAPSIMALIS, B.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin
Arch. oral Biol. 11, 549 (1966)
- GIBBONS, R.J.: Formation and significance of bacterial Polysaccharide in caries etiology
Caries Res. 2, 164 (1968)
- GUGGENHEIM, B. und SCHRÖDER, H.E.: Biochemical and morphological aspects of extrazellulär polysaccharids produced by cariogenic streptococci
Helv. odont. Acta 11, 131 (1967)
- GUGGENHEIM, B.: Streptococci of dental plaque
Caries Res. 2, 247 (1968)
- GUGGENHEIM, B.: Extracellular polysaccharides and microbial plaque
Int. dent. J. 20, 657 (1970)
- HARDIE, J.M. und BOWDEN, G.H.: Cell wall and serological studies on streptococcus mutans
Caries Res. 8, 301 (1974)
- HANSEN, H.L., FOSDICK, L.S. und EPPLE, C.F.: The action of mouth organisms on certain carbohydrates
J. Amer. dent. Ass. 24, 1611 (1937)
- HOERMANN, K.C., KEENE, H.J., SHKLAIR, J.L. und BURMEISTER, J.A.: The association of streptococcus mutans with early carious lesions in human teeth
J. Amer. dent. Ass. 85, 1349 (1972)

- HOEVEN, J.S. van der, TOOROP, A.I. und MIKX, F.H.M.:
Symbiotic relationship of veillonella
alcalescens and streptococcus mutans in
dental plaque in gnotobiotic rats
Caries Res. 12, 142 (1978)
- HOUTE, J. van, WINKLER, K.L. und JANSEN, H.M.:
Jodophilic polysaccharide sythesis, acid
production and growth in oral streptococci
Arch. oral Biol. 14, 45 (1969)
- JKEDA, T., SANDHAM, H.J. and BRADLEY, E.L.: Changes
in streptococcus mutans and Lactobacilli in
plaque in relation to the initiation of dental
caries in negro children
Arch. oral Biol. 18, 555 (1973)
- JORDAN, H.V., ENGLÄNDER, H.R. und LIM, S.: Potentially
cariogenic streptococci in selected population
groups in the western hemisphere
J. Amer. dent. Ass. 78, 1335 (1969)
- KEYES, P.H.: Present and future measures for dental
caries
J. Amer. dent. Ass. 79, 1395 (1969)
- KRASSE, B.: Human streptococci and experimental caries
in hamsters
Arch. oral Biol. 11, 429 (1966)
- KRASSE, B., JORDAN, A.V., EDWARDSSON, S., SVENSSON, I.
und TRELLE, L.: The occurrence of certain
"caries - inducing" streptococci in human
dental plaque material
Arch. oral Biol. 13, 911 (1968)
- KRÖNCKE, A. und LÄSSIG, C.: Amylaseaktivität und
Atmung des menschlichen Speichels
Arch. oral Biol. 5, 31 (1961)

- LUNDQVIST, C.: Oral sugar clearance
Odont. Revy 3, Suppl. 1 (1952)
- MICHALEK, S.M., MC GHEE, J.R., SHIOTA, T. und
DEVENYNS, D.: Low sucrose levels promote
extensive streptococcus mutans, induced
dental caries
Infection and Immunity 16, No. 2, 712 (1977)
- MICHALEK, S.M., MC GHEE, J.R., SHIOTA, T. und
DEVENYNS, D.: Virulence of streptococcus
mutans: Cariogenicity of strep. mutans in
adult gnotobiotic rats
Infection and Immunity 15, No. 2, 466 (1977)
- MILLER, CH.H. und KLEINMANN, J.L.: Effect of microbial
interaction on in vitro plaque formation by
streptococcus mutans
J. dent. Res. 53, H 2/2, 427 (1974)
- MIKX, F.H.M., HOEVEN, J.S. VAN DER, KÖNIG, K.G.,
PLASSCHAERT, A.J.M., und GUGGENHEIM, B.:
Establishment of defined microbial ecosystem
in germ-free rats
Caries Res. 6, 211 (1972)
- MIKX, F.H.M. und HOEVEN, J.S. VAN DER: Symbiosis
of streptococcus mutans and veillonella
alcalescens in mixed continous culture
Arch. oral Biol. 20, 407 (1975)
- MOLL, C.P.: Enzymatische Bestimmung des Glukoseabbaus und
der Milchsäurebildung durch isolierte Streptococcen
Med. Diss. Erlangen 1970
- MONTVILLE, T.J., COONEY, C.L. und SINSKEY, A.J.:
Measurement and synthesis of insoluble and
soluble dextran by S. mutans
J. dent. Res. 56 (8), 983 (1977)
- PARSON, J.C. und MILLER, C.H.: Plaque formation by mixed
culture of non primary plaque-forming microorganisms
J. dent. Res. 53, 825 (1974)

- PROBST-STEINMANN, M.: Über die Säurebildung verschiedener
Stämme kariogener Streptokokken unter dem Ein-
fluß von Chlorhexidin
Med. Diss. Erlangen 1979
- QURESHI, J.V., GOLDNER, M., LE RICHE, W.H. und
HARGREAVES, J.A.: Streptococcus mutans sero-
types in young schoolchildren
Caries Res. 11, 141 (1977)
- RANKE, B., BRAMSTEDT, F. und NAUJOKS, R.: Untersuchungen
mit markierten Verbindungen über den Kohlenhydrat-
abbau in den Plaques
Adv. Fluorine Res. and Dental Caries Prevention 2,
189 (1964)
- RANKE, B. und RANKE, E.: Zur Bedeutung verschiedener
Plaque Streptokokken für die Karies
Dtsch. zahnärztl. Z. 25, 270 (1970)
- RANKE, B. und RANKE, E.: Untersuchungen zur Kariogenität
extrazellulärer Polysaccharide bildender Strepto-
kokken aus menschlicher Zahnplaque
Dtsch. zahnärztl. Z. 26, 29 (1971)
- ROGOSA, M., KRICHEVSKY, M.I. und BISHOP, F.S.:
Truncated glycolytic system in veillonella
J. Bact. 90 (1965)
- SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974
- SCHMID, F.: Wachstumsverhalten kariogener Streptokokken
auf Glukose Nährböden
Med. Diss. Erlangen 1974
- SHKLAIR, J.L., KEENE, H.J. und SIMONSON, L.G.:
Distribution and frequency of streptococcus
mutans in caries-active individuals
J. dent. Res. 51, 882 (1972)

- SHKLAIR, J.L. und KEENE, H.J.: A biochemical scheme for separation of the five varieties of streptococcus mutans
Arch. oral Biol. 19, 1079 (1974)
- STANLEY, A.R. und KRICHEVSKY, M.J.: Acid production from glucose and sucrose by growing culture of caries-conductive streptococci
J. dent. Res. 51, H3, 734 (1972)
- STEPHAN, R.M. und HEMMENS, E.S.: Studies of changes in pH produced by pure culture of oral micro-organisms
J. dent. Res. 26, 15 (1947)
- STOPPELAR, J.D.DE, HOUTE, J. VAN und BACKER, D.O.: The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year old children
Caries Res. 3, 190 (1969)
- STOPPELAR, J.D.DE, KÖNIG, K.G., PLASSCHAERT, A.J.M. und HOEVEN, J.S. VAN DER: Decreased cariogenicity of mutant of streptococcus mutans
Arch. oral Biol. 16, 971 (1971)
- STOPPELAR, J.D.DE: Streptococcus mutans, streptococcus sanguis and dental caries
Publication from the Departement of Preventive Dentistry, University of Utrecht Holland (1971)
- STRÄLFORS, A.: A investigation into the bacterial chemistry of dental plaque
Odont. T. 58, 155 (1950)
- TANZER, J.M., KRICHEVSKY, M.J. und KEYES, P.H.: The metabolic fate of glucose catabolizes by a washed stationary phase caries-conductive streptococcus
Caries Res. 3, 167 (1969)

- TISCHER, K.: Zur pH-Abhängigkeit des Glukoseabbaus und der Milchsäurebildung isolierter Plaquestreptokokken
Med. Diss. Erlangen 1979
- TRAUTNER, K., GEHRING, F. und LOHMANN, D.: Extracellular glucans sythesised by strains of two types of streptococcus mutans in vitro
Arch. oral Biol. 23, 175 (1978)
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. und STAUFFER, J.F.:
Manometric techniques
Burgess Publishing Company Minneapolis
(1964) 4th ed.
- WICKEN, A.J. und KNOX, K.W.: Lipoteichoic acids:
A new class of bacterial antigen
Science 187, 1161 (1975)
- WOOD, J.M. und CRITCHLEY, P.: The extracellular polysaccharides produced from sucrose by a cariogenic streptococcus
Arch. oral Biol. 11, 1039 (1966)
- WÜRTH, W.: pH-Messung an isolierten Strep. mutans Stämmen während der Glukosefermentation in Abhängigkeit der Pufferkonzentration
(unveröffentlichte Arbeit)
- ZINNER, D. und JABLON, J.: Human streptococcal strains in experimental caries
In: Art and science of dental caries research
(ed. R.S. Harris), p. 88. Academic Press, New York

Herrn Prof. Dr. Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen bei der Bearbeitung. Weiterhin habe ich ihm zu danken, daß er es mir ermöglichte, die Versuche im biochemischen Labor der Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie durchführen zu können.

Herrn Dr. Distler, wie auch Frau Degiorgio und Frl. Lechner sage ich Dank für ihre Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Geboren am 3.1.1950	in Fürth/Bay. als Tochter des Zahn- arztes Dr. Gerhard Wendel und sei- ner Ehefrau Anneliese, geb. Höhne
ab 1956	Besuch der Volkshauptschule in Wilhermsdorf
September 1961	Übergang in das Heinrich Schliemann Gymnasium in Fürth
September 1967	Wechsel an das Neusprachliche Gym- nasium und Landschulheim Schule Schloß Schwarzenberg in Scheinfeld
20. Juni 1970	Reifeprüfung
September 1970 bis Juli 1972	Ausbildung als Zahnarzthelferin
11. Juli 1972	Abschluß der Lehrzeit mit der staatlichen Prüfung
ab WS 1973	Studium der Geologie und Palaeonto- logie an der Friedrich-Alexander- Universität Erlangen-Nürnberg
Oktober 1974 bis Juli 1979	Zahnmedizinstudium an der Friedrich- Alexander-Universität Erlangen- Nürnberg
August 1979 bis November 1979	Zahnärztliche Prüfung

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131 - 26197